

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS PROF. ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA DELAGARTO - DOL

THAINAN DE SANTANA BORGES

**ANÁLISE DA LIGAÇÃO RAGE/HMGB1 NO VOLUME ÓSSEO
DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

**LAGARTO- SE
2018**

THAINAN DE SANTANA BORGES

**ANÁLISE DA LIGAÇÃO RAGE/HMGB1 NO VOLUME ÓSSEO
DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Sergipe, como requisito
parcial à obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo PalanchRepeke

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Luiz LimaTaga

**LAGARTO- SE
2018**

THAINAN DE SANTANA BORGES

**ANÁLISE DA LIGAÇÃO RAGE/HMGB1 NO VOLUME ÓSSEO
DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Sergipe, como requisito
parcial à obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Apresentado em: ____ / ____ / ____

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo PalanchRepeke

Prof. Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto

Prof. Dr. José Eduardo Chorres Rodríguez

**LAGARTO
2018**

RESUMO

A modulação da resposta imune/inflamatória é uma estratégia adotada para entender e melhorar o processo de reparo ósseo. Com a descoberta da sinalização inflamatória mediada pelo receptor RAGE e o ligante HMGB1, surgiram novas possibilidades de estudo entre a relação do sistema imune e o sistema ósseo. O objetivo foi elucidar a influencia do complexo RAGE/HMGB1 na densidade óssea do reparo ósseo alveolar após a exodontia do incisivo superior em camundongos. Foram utilizados 40 camundongos divididos em dois grupos [Grupo controle- WT; Grupo GLY – tratado com glicirrizina (inibidor de HMGB1)] e analisados após exodontia. Na análise histomorfométrica, em relação a matriz óssea foi observado uma cinética muito semelhante entre os grupos WT e GLY. Apesar de não demonstrar diferença significativa na formação óssea, o grupo GLY apresentou menores densidade no volume de osteoblastos e maiores de osteoclastos comparado ao grupo controle nos tempos de 7 e 14 dias ($p<0,05$). De forma similar a densidade de volume de osteoblastos, os camundongos GLY apresentaram menor densidade de tecido ósseo ao 21º dia, sendo que essa densidade foi maior quando comparados com os camundongos WT. Conclui-se que a inibição da proteína HMGB1 resultou em pequenas alterações na cinética de reparo ósseo alveolar em camundongos, apresentando diferenças no volume de osteoblastos e osteoclastos, componentes participantes da cinética do reparo ósseo alveolar.

Palavras-chave: proteína HMGB1, inflamação, imunologia.

ABSTRACT

The bone repair development and neoformation processes are essential for tissue homeostasis after trauma or bone loss. Thus, modulation of immune / inflammatory response is a strategy to understand and improve this process. Interesting possibilities emerging to correlate immune system and bone system, after the discovery of inflammatory signaling mediated by the RAGE receptor and the HMGB1 ligand. In this way, this study aimed to elucidate the influence of the RAGE / HMGB1 complex in the immune / inflammatory response after exodontia of the upper incisor of C57Bl/7 mice. 40 mice were divided into two groups [Control Group - WT; Group GLY - treated with glycyrrhizin (HMGB1 inhibitor)] and analyzed in 0, 7, 14, 21 days after exodontia. Histomorphometric analysis showed a very similar kinetics between WT and GLY groups in relation to the bone matrix. GLY group presented a lower density in the osteoblast volume and higher amount of osteoclast compared to control group at 7 and 14 days ($p < 0.05$). Similarly, to volume density of osteoblasts, GLY presented lower bone density at day 21, and this density was higher when compared to WT mice. Therefore, inhibition of HMGB1 was not able to interfere with the kinetics of alveolar bone repair in mice, however showed differences in some components involved in the kinetics of alveolar bone repair.

Key words: HMGB1, inflammation, immunology, osteoimmunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem histológica com coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 40x; barra de escala = 100 μ m. -----	12
Figura 2 - Análise comparativa da densidade de área (%) da matriz óssea no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY).-----	19
Figura 3 - Análise comparativa da densidade de área (%) de osteoblastos no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY). -----	20
Figura 4 - Análise comparativa da densidade de área (%) de osteoclastos no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY). -----	21
Figura 5 - Análise comparativa da densidade de área (%) do Tecido Ósseo, Soma da matrix óssea, osteoblastos e osteoclastos presentes no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY). -----	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
°C	grau Celsius
µm	Micrometro
ALP	fosfatase alcalina
AP-1	proteína ativadora 1
BV	volume de osso
BV/TV	densidade de volume de osso
C57Bl/6 (WT)	camundongo 57 black/6
COL – 1	colágeno do tipo 1
CT	ciclo limiar
cm	Centímetro
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
DNA	ácido desoxirribonucléico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
EDTA	ácidoetilenodiaminotetraacético
et al.	Colaboradores
FGF	fator de crescimento fibroblasto
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
GLY	Glicirrizina
HE	hematoxilina e eosina
HMBG1	caixa 1 de grupo de alta mobilidade
HSP	proteína de choque térmico
h	Horas
IGF	fator de crescimento insulina
kDa	unidade de massa atômica
LTDA	sociedade empresarial de responsabilidade limitada
mg/Kg	miligramma por quilo
MVs	matriz extracelular
MyD88	gene de resposta primária de diferenciação mieloide 88
NFκB	fator de transcrição nuclear kappa B
NLRs	receptores do tipo NOD

nSMase2	Esfingomielinase-2
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
pH	potencial hidrogeniônico
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
P38 MAPK	proteínaquinase ativada por mitógeno P38
RAGE	receptor para produtos finais de glicosilação avançada
RANK	receptor de ativação do fator nuclear Kappa
RANKL	ligante do receptor de ativação do fator nuclear Kappa
Runx2	fator de transcrição ao runt 2
RNA	ácido ribonucléico
Tb.N	Número trabecular
Tb.Sp	espaçamento trabecular
Tb.Th	espessura trabecular
TV	volumetrabecular
TLRs	receptores semelhantes a Toll
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
WT	camundongos normais

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	OBJETIVOS.....	14
	OBJETIVO GERAL:.....	14
	OBJETIVO ESPECÍFICO:	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	15
	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	15
	PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS	16
	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	17
	PROCEDIMENTO DE IMUNOISTOQUÍMICA	18
	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4.	RESULTADOS	18
	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	18
	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUDONGOS	20
5.	DISCUSSÃO	24
6.	CONCLUSÃO.....	27
7.	REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Posteriormente ao trauma ou perda de tecido ósseo o desenvolvimento adequado do processo de reparo e neoformação óssea são essenciais para o restabelecimento da homeostasia tecidual e recuperação de suas funções, favorecendo as possíveis terapias reabilitadoras (PERES; LAMANO, 2011). Diversas frentes de estudo buscam intensificar o processo de neoformação e reparo ósseo, incluindo desde estudos com diferentes biomateriaisaté modulação da resposta imune/inflamatória, que envolve a interação de células ósseas e mediadores imunológicos, cuja relação com a formação óssea mostra-se extremamente importante para o processo de reparo, todavia tal interação permanece pouco compreendida (MILLS; SIMPSON, 2012). Enquanto uma resposta imune/inflamatória exacerbada está associada à reabsorção óssea, estudos mostram que a inibição da resposta imune/inflamatória com antiinflamatórios (mesmos os mais específicos como os não-esteroidais) influência de forma negativa os processos de reparo ósseo e a osseointegração (KALYVAS; TARENIDOU, 2008; JACOBSSON et al., 1994).

Por outro lado, encontramos na literatura evidências apontando que atenuar a severidade da resposta imunológica pode intervir positivamente no tempo de neoformação óssea. (REPEKE et al., 2010; MIDWOOD; PICCININI, 2010). Estudos que tratam da interação resposta imune/inflamatória e reparo ósseo ainda são escassos, já que a maioria dos estudos encontrados na literatura tem se concentrado na influência de células e mediadores imunológicos na ativação de osteoclastos e no processo de reabsorção óssea (THEILL; BOYLE; PENNINGER, 2002). Do ponto de vista clínico, não se sabe exatamente quando é realmente necessária a modulação da resposta imune e inflamatória, uma vez que dependendo do tipo e intensidade da resposta, seu impacto no tecido ósseo pode variar significativamente.

Sabe-se que, o processo de reparo ósseo inicia com a formação de um coágulo sanguíneo, seguido por infiltração de células inflamatórias e posteriormente, a migração de tecido granulação que ajuda a estabilizar a matriz extracelular. Este tecido de granulação é eventualmente substituído por tecido ósseo recém formado e, finalmente, por osso lamelar e medula óssea, em maior grau de mineralização (LIN et al., 2011). Convenciona-se que a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro envolve etapas características, entre as quais podemos destacar as fases de reconhecimento, efetuação e regulação.

Existem diversos grupos de receptores do sistema imune que são importantes para o reconhecimento e ativação da resposta pró-inflamatória, denominados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)(TANG et al., 2012; BIDWELL; YANG; ROBLING,

2008). Por meio da expressão de PRRs, diversos tipos celulares possuem a capacidade de identificar diferentes moléculas provenientes de microrganismos, coletivamente denominadas PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009). Sendo as PAMPs moléculas derivadas de patógenos, naturalmente associadas a estímulos infecciosos, as moléculas derivadas do próprio hospedeiro, DAMPs (padrões moleculares associados a danos) são liberadas em situações de estresse, dano e/ou morte celular ou ainda lesão dos tecidos (TANG et al., 2012). Apesar de diferentes origens, tanto PAMPs quanto DAMPs podem compartilhar receptores (PRRs) semelhantes na fase inicial de reconhecimento e ativação da resposta, sendo que ambos podem gerar efeitos inflamatórios (FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009; BIANCHI, 2006). No âmbito do processo de reparo ósseo alveolar, tanto PAMPs como DAMPs podem estar presentes, embora se acredite que em condições homeostáticas e "ideais" (não infecciosas), a presença microbiana seja relativamente baixa, e consequentemente os DAMPs desempenhariam um papel potencialmente mais importante que PAMPs na iniciação da resposta do hospedeiro.

Entre os principais DAMPs reconhecidos pelos receptores TLRs está a proteína HMGB1 ("high-mobilitygroup Box-1"). HMGB1 é formada por 215 aminoácidos, possui peso molecular estimado em 30 kDa e apresenta três domínios funcionais. Os dois primeiros consistem em dois box (box A e box B) carregadas positivamente com atividade de ligação ao DNA e uma cauda C-terminal (terminal carboxilo) com carga negativa que promove a ligação ao nucleossoma e aumenta atividade transcracional da proteína. Além disso, o box B também contém a atividade relacionadas a citocinas enquanto que o box A possui função oposta (MAGNA; PISETSKY, 2014; BIDWELL; YANG; ROBLING, 2008).

Estudos apontam que a proteína HMGB1 está associada aos receptores RAGE (prioritariamente), TLR2 e TLR4, portanto, demonstra ser capaz de induzir a produção de diversas citocinas que possuem papéis fundamentais na resposta imune/inflamatória e no processo de reparo tecidual em geral (MAGNA; PISETSKY, 2014; SAKAI et al., 2012). Em relação ao reparo do tecido ósseo, HMGB1 demonstra ser liberada por osteoblastos e osteócitos, apresentando-se como molécula alvo para a iniciação da resposta inflamatória posterior ao trauma do tecido ósseo (YANG et al., 2008). Dentre as variadas funções, a HMGB1 atua de forma semelhante a uma citocina pró-inflamatória, tendo sido demonstrada sua participação na osteoclastogênese na presença de RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κB), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear κB) e osteoprotegerina (OPG), que atua como receptor "decoy" de RANKL sendo identificados

como os principais componentes moleculares do sistema de remodelação óssea(SAKAI et al., 2012).

O receptor RAGE (receptor para produtos finais de glicosilação avançada) também apresenta relevante participação no reconhecimento de diversas DAMPs. O receptor RAGE é um componente transmembranar que faz parte do grupo das imunoglobulinas capaz de induzir a resposta inflamatória através da união em diversos ligantes, como o HMGB1. Além do mais, RAGE tem apresentado a capacidade de se ligar diretamente em dsRNA e dsDNA in vitro, sugerindo uma participação no inicio da resposta inflamatória asséptica, como é o caso de traumas ósseos. Como mostrado em estudo in vitro, a sinalização HMGB1 através de RAGE medeia quimiotaxia; proliferação e diferenciação de células imunes e outras células; e regulação positiva dos receptores de superfície celular, incluindo TLR4 (ANDERSSON; TRACEY, 2011).

Referente ao tecido ósseo, camundongos geneticamente deficientes para não apresentar o receptor RAGE possuem uma massa óssea maior quando comparados a camundongos normais (WT) e um número menor na quantidade de osteoclastos, demonstrando um papel importante no metabolismo ósseo (DING et al., 2006). Quando ativado, o receptor RAGE gera uma cascata de sinalização responsável pela translocação para o núcleo celular dos fatores de transcrição NFkB e AP-1, fundamentais na formação e ativação de osteoclastos e importantes na transcrição de diversas citocinas e quimiocinas de caráter inflamatório (cascata esta que ativa os mesmos fatores de transcrição da cascata via TLR4) (SORCI et al., 2013).

De forma geral, observamos um mecanismo fundamental para a resposta imune/inflamatória, tanto receptores da família TLRs, quanto RAGE demonstram através de suas características alvos em potencial para novas estratégias de aperfeiçoar e entender o processo de reparo ósseo. Consequentemente surgem novos questionamentos sob a atuação e a relevância dessas moléculas para a formação óssea. E principalmente, dúvidas sobre qual a intensidade de ativação necessária dos receptores TLRs e RAGE via HMGB1, para que haja uma resposta imune/inflamatória controlada, afim de um reparo ósseo rápido e eficiente, e não uma resposta inflamatória de maneira exacerbada, prejudicando o reparo ósseo normal.

Desse modo, a descoberta das sinalizações mediadas pelo ligante HMGB1 apresenta-se como um possível alvo de interesse para o estudo entre a relação do sistema imune e ósseo (osteoinmunologia). Os resultados do presente estudo visam contribuir para o aprimoramento dos conhecimentos dos mecanismos celulares envolvidos na resposta imune/inflamatória necessária para o reparo do tecido ósseo.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Caracterizar a influência de HMGB1 na resposta imune/inflamatória em relação a densidade de volume ósseo no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Analisar morfometricamente o processo de reparo ósseo alveolar em camundongos C57Bl/6 por meio da inibição de HMGB1 através da droga Glicirrizina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 40 camundongos C57Bl/6 (WT), do tipo selvagem, machos, com idade aproximada de 8 semanas e divididos em dois grupos (controle-WT e GLY- tratado com glicirrizina), os quais foram obtidos e mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Durante o protocolo experimental todos os animais foram dispostos em gaiolas de polipropileno (cinco camundongos por gaiola), com temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e no ciclo de 12 horas claro/escuro. Foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) e água, sendo ofertado ração triturada por 24hs após a cirurgia. Os 20 animais de cada grupo foram analisados de acordo com os períodos pós exodontia (0h, 7, 14 e 21 dias). Para cada período foram utilizados 5 camundongos para a análise histomorfométrica.

Os animais do grupo experimental (GLY) foram tratados com glicirrizina, um glicósideo de triterpeno natural derivado do alcaçuz, no qual estudos anteriores demonstraram que a glicirrizina inibi a atividade de HMGB1 (ZHAO et al., 2017; MOLLICA et al., 2007). Para administração via intraperitoneal, foram diluídos 200mg/kg em 1 ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato) e DMSO (sulfóxido de dimetilo) e administrado doses de 1mg/kg a cada 24hs nos períodos iniciais.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

As exodontias foram realizadas com os animais sob anestesia geral via intramuscular com cloridrato de quetamina injetável com nome comercial de Dopalen® (Agribrans do Brasil LTDA) na dosagem de 100mg/kg e cloridrato de xilazina injetável com nome comercial de Anasedan® (Agribrands do Brasil LTDA) na dosagem de 20mg/kg. O incisivo superior direito de cada animal foi extraído com a utilização de uma sonda exploradora nº5 devidamente afiada para desinserção dos tecidos moles e luxação do dente e uma pinça previamente desgastada para a apreensão e extração do dente. Ao final de cada período experimental (0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), os animais foram eutanasiados por meio de injeção de dose excessiva de anestésico via intramuscular. Em seguida, as amostras constituídas pelas maxilas contendo os alvéolos foram coletadas com o emprego de uma

lâmina n° 20 acoplada ao cabo de bisturi e a carcaça desses animais foram congeladas e descartadas no lixo biológico aos cuidados da FOB-USP.

Incialmente, uma maxila de cada período (0h, 7, 14 e 21 dias) de ambos os grupos foram previamente fixadas e destinadas à obtenção das imagens pela técnica de microtomografia computadorizada. Posteriormente, as amostras destinadas à análises microscópicas foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% (pH 7,2), armazenadas em temperatura ambiente e depois lavadas em água corrente (“over-night”). O acondicionamento em etanol 70% foi um cuidado adicional, cujo objetivo era manter a fixação previamente obtida com o formol, mas evitar a superfixação do tecido por este primeiro reagente, o que poderia desnaturar os antígenos necessários para a marcação de imuno-histoquímica.

PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS

Após a fixação em formol por 48 horas, acondicionamento em fixador alcóolico, as amostras foram lavadas e desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura ambiente, por um período aproximado de quarenta dias, respeitando as trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas visando à total remoção de EDTA, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, foi realizada a desidratação das amostras em 3 banhos de soluções de etanol 100% (dois banhos de 4 horas, seguido por um banho de 12 horas). Em seguida as amostras desidratadas passaram por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e foram incluídas em parafina para confecção dos blocos. Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no eixo transversal (perpendicular ao longo eixo do alvéolo dental), utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), com intervalos de 500µm, abrangendo os terços coronal, médio e apical do alvéolo (VIEIRA et al., 2015). Todo o processo histológico foi realizado no laboratório do departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP).

PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para as análises histológicas histomorfométrica (quantitativa), foram obtidas 6 lâminas de cada animal, com 8 cortes semi-seriados em cada lâmina, os quais foram corados em HE e observados e analisados em microscópio óptico. A análise histológica descritiva foi realizada com emprego de um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), sendo considerado o terço médio do alvéolo dental dos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para ambos os grupos. Optou-se por uma análise descritiva mais detalhada em objetiva de aumento de 40x, acompanhando os eventos de reparação óssea e tecido ósseo neoformado. A análise histomorfométrica foi realizada por meio da avaliação da densidade de área das estruturas constituintes do tecido alveolar durante o reparo, sendo considerados os seguintes parâmetros histológicos: matriz óssea; osteoblastos; osteoclastos; e a soma das estruturas (tecido ósseo). A densidade de área foi obtida por meio de contagem de pontos coincidentes sobre os critérios histológicos supracitados, com o emprego de uma lente ocular 15X, F.N. 12, um retículo de contagem com referência de 1x1 e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, em microscópio óptico binocular (OLYMPUS CX21). O retículo utilizado constitui uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos. Assim, a sobreposição do retículo sobre o campo histológico permitiu a contagem de estruturas que eram coincidentes com os pontos do retículo, no qual foram considerados ao todo 13 campos microscópicos distintos, dispostos regular e sistematicamente sobre um único corte histológico. Para cada animal, consideram pelo menos 3 cortes histológicos abrangendo o terço médio do alvéolo, sendo portanto contados ao todo 39 campos. Os campos foram escolhidos com intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte. O cálculo da densidade de área (Da) foi obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas (Pi) e o número total de pontos existentes no retículo (P), sendo adotada a seguinte regra ($Da = 100 \times [\Sigma Pi / \Sigma P]$). O total de pontos ocupados pelo alvéolo foi considerado 100%, sendo Pi estabelecido como percentual relativo a este, ocupado por cada uma das estruturas consideradas com os valores resultantes da contagem dos 3 cortes histológicos de cada animal (VIEIRA et al., 2015). Posteriormente foram calculadas a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo. A etapa de análise histológica foi realizada no laboratório de radiologia do departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe (DOD-UFS).

PROCEDIMENTO DE IMUNOISTOQUÍMICA

Para a determinação dos padrões moleculares seguindo o reparo foram utilizados marcadores imunohistoquímicos para RAGE. Desse modo, cortes de 5 μ m foram tratados com proteinase K por 30 minutos, a temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2% por 10 minutos e lavados em PBS (Phosphate buffer solution). Após este período, foram utilizados os anticorpos primários policlonais anti-RAGE (Santa Cruz, USA), em temperatura ambiente por 24 horas, elevados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Após isto, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos, e em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contracorados com Hematoxilina de Harris. Os mesmos procedimentos foram repetidos para os marcadores anti-RAGE (Santa Cruz, USA).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análises entre apenas dois grupos foi utilizado o teste “t” Student. As análises de mais de dois grupos foram utilizadas o teste de variância (ONE WAY ANOVA) seguido do *post test Tukey*. Para todas as análises, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados através do programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

O primeiro passo do nosso estudo foi verificar se na cinética do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos o receptor RAGE se encontra presente, em qual quantidade e qual a localização das células RAGE+ (figura 1).

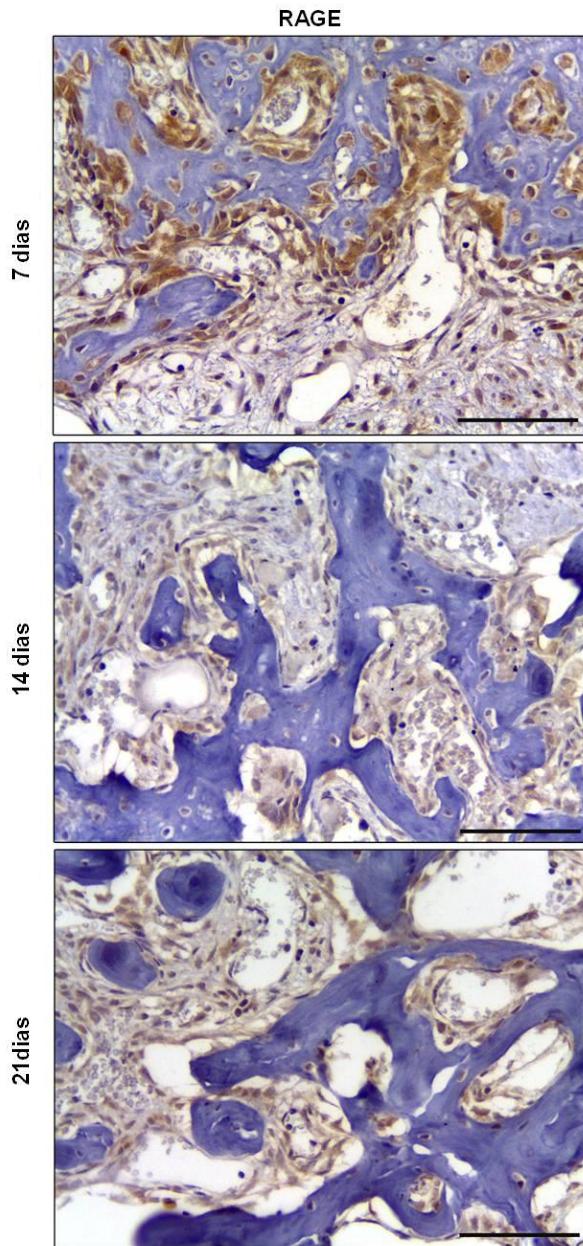


Figura 1 - Análise imuno-histoquímica para células RAGE+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia em camundongos C57Bl/6-WT. Coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 40x; barra de escala = 100µm.

Utilizou-se análise imuno-histoquímica para detectar células RAGE+ nos alvéolos dentais de camundongos WT ao longo de diferentes estágios do processo de reparo alveolar (0 hora, 7, 14 e 21 dias). Entretanto, no período de 0 hora na imunomarcação não foi detectada. Conforme exemplificado nas fotomicrografias (Figura 1), obteve-se um padrão satisfatório de imunomarcação citoplasmática para o receptor, de modo que a marcação para RAGE foi mais evidente nos locais de neoformação óssea (Figura 1). Observou-se que as células RAGE+ se

encontravam em maior número no período de 7 dias, diminuindo no período de 14 dias, e, tendo uma redução significativa para o tempo de 21 dias.

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUDONGOS

Para a análise quantitativa, as estruturas descritas foram previamente categorizadas dentro de diferentes parâmetros histológicos, tais como: matriz óssea (Figura 2), osteoblastos (Figura 3), osteoclastos (Figura 4) e o tecido ósseo geral (Figura 5). Dessa forma, cortes histológicos do terço médio do alvéolo dental dos camundongos foram corados em HE. Foram sistematicamente quantificados por meio de cálculo de densidade de área (%), permitindo assim uma análise comparativa dos eventos ocorridos entre os grupos WT e GLY durante os períodos de 0h, 7, 14, e 21 dias.

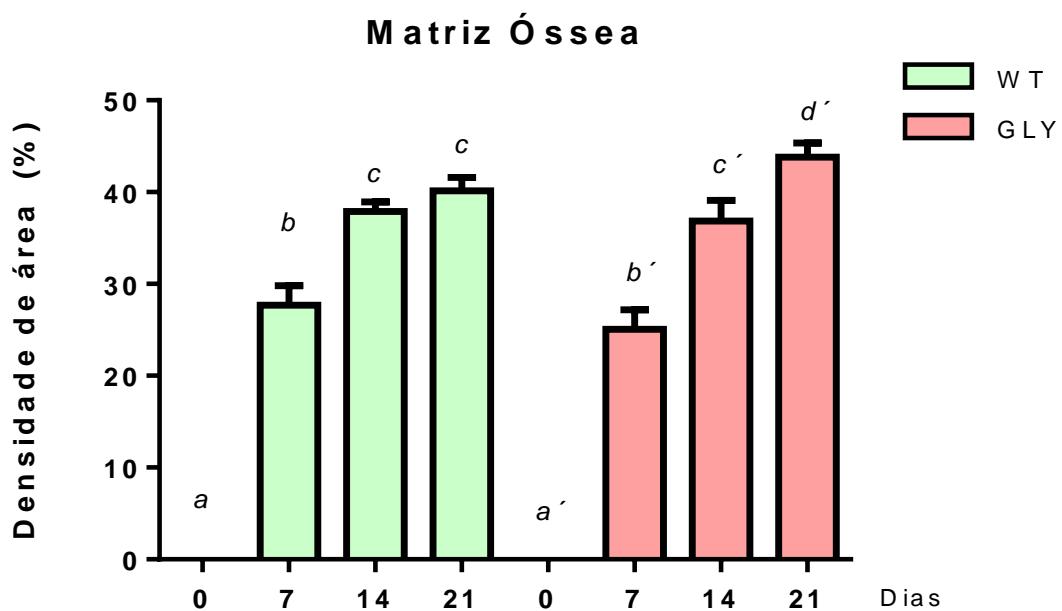


Figura 2 - Análise comparativa da densidade de área (%) da matriz óssea no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY) nos períodos de 0 h, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e GLY, dentro do mesmo período experimental. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro do grupo entre os períodos analisados.

Em relação a matriz óssea foi observado uma cinética muito semelhante entre os grupos WT e GLY ($p > 0,05$ entra os grupos no mesmo período). Obtendo um aumento

significativo no primeiro período (7 dias, $p<0,05$) e aumentando da densidade de volume de matriz óssea ainda mais no tempo de 14 e 21 dias (Figura 2).

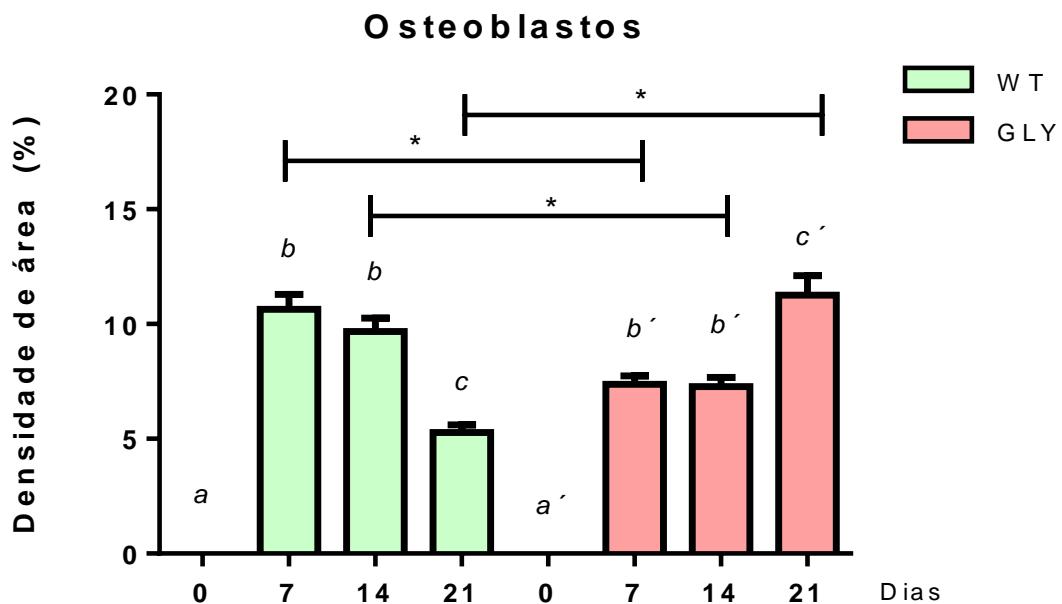


Figura 3 - Análise comparativa da densidade de área (%) de osteoblastos no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY) nos períodos de 0 h, 7, 14 e 21 dias pós- exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio padrão em cada um dos períodos analisados. * $p< 0,05$ indica diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e GLY, dentro do mesmo período experimental. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro do grupo entre os períodos analisados.

Os camundongos GLY apresentaram menor densidade de volume de osteoblastos nos períodos de 7 e 14 dias, e apenas ao 21º dia que essa densidade foi maior quando comparados com os camundongos WT $p<0,05$ (Figura3). Observou-se que os camundongos WT tiveram uma redução de osteoblasto no ultimo período, evento este não ocorrido quando foi utilizado a glicirrezina (grupo GLY), cuja cinética de osteoblasto continuou aumentando significativamente mesmo período de 21 dias ($p<0.05$).

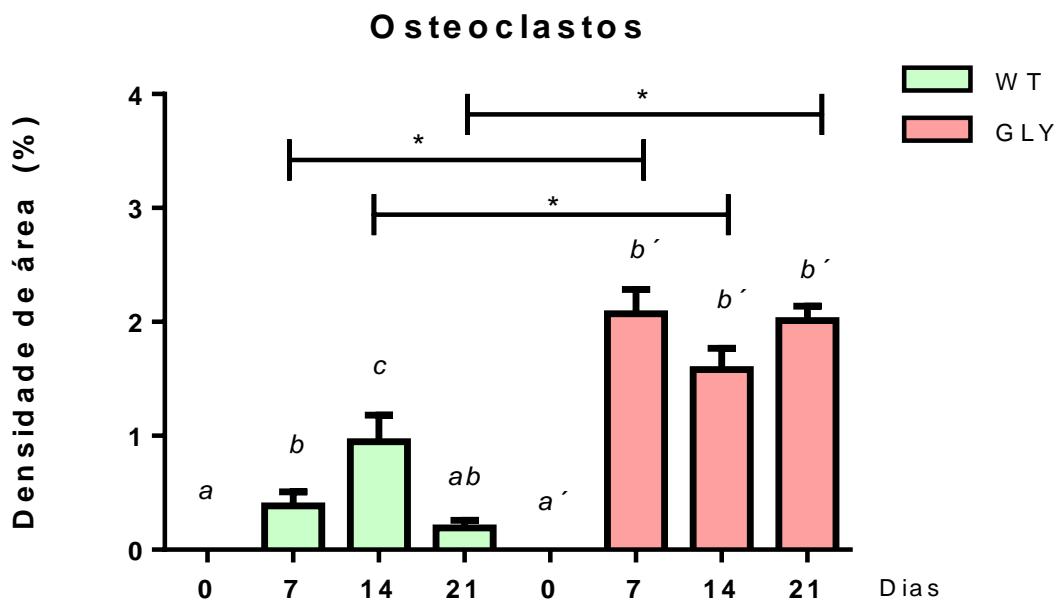


Figura 4 - Análise comparativa da densidade de área (%) de osteoclastos no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY) nos períodos de 0 h, 7, 14 e 21 dias pós- exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e GLY, dentro do mesmo período experimental. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro do grupo entre os períodos analisados.

Já em relação aos osteoclastos, os camundongos GLY apresentaram maior densidade de área nos períodos de 7, 14 e 21 dias quando comparados com os camundongos WT, $p < 0,05$; (Figura 4).

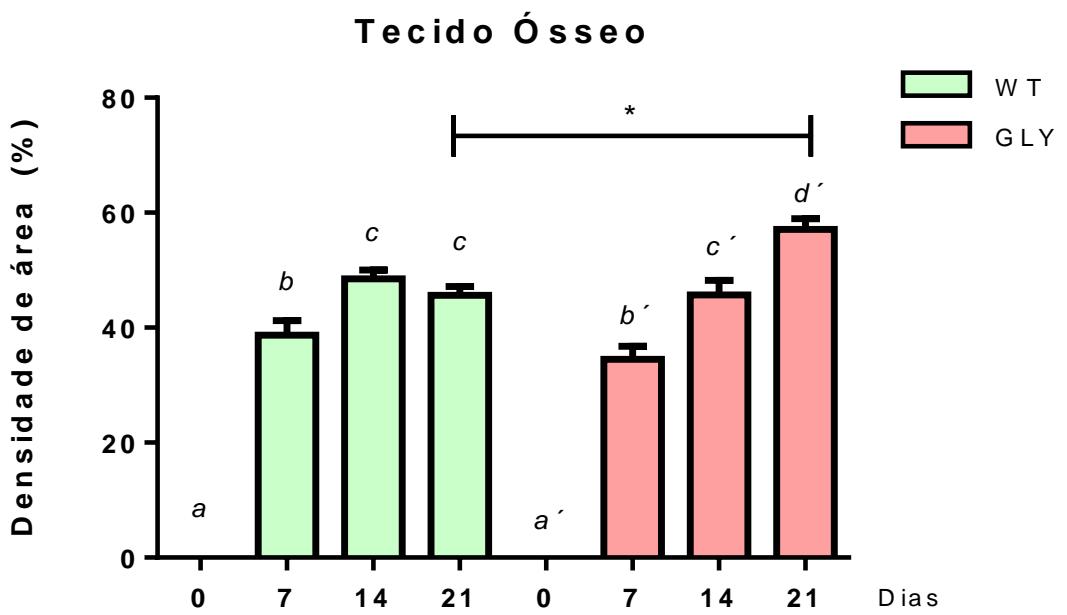


Figura 5 - Análise comparativa da densidade de área (%) do Tecido Ósseo, Soma da matrix óssea, osteoblastos e osteoclastos presentes no alvéolo dental de camundongos dos grupos controle (WT) e experimental (GLY) nos períodos de 0 h, 7, 14 e 21 dias pós- exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio padrão em cada um dos períodos analisados. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significante entre os grupos WT e GLY, dentro do mesmo período experimental. As letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante dentro do grupo entre os períodos analisados.

De forma similar a densidade de volume de osteoblastos, os camundongos GLY apresentaram menor densidade de tecido ósseo ao 21º dia, sendo que essa densidade foi maior quando comparados com os camundongos WT $p < 0,05$; (Figura 5). Observou-se que os camundongos WT tiveram uma redução de tecido ósseo no último período, o que não ocorreu nos camundongos GLY, cuja cinética de osteoblasto continuou aumentando significativamente mesmo período de 21 dias ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo alveolar apresenta-se como um modelo de estudo interessante por se tratar de um processo complexo, sequencial e regulado por diferentes tipos de células e tecidos (LIN et al., 2011). Sendo assim um processo que permite uma possível compreensão da interação do sistema imunológico e ósseo através de análises histológicas, como o realizado neste estudo.

O primeiro passo desse estudo foi verificar se na cinética do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos o receptor RAGE se encontra presente, em qual quantidade e qual a localização das células RAGE+. Observamos que a uma grande presença de células RAGE+ principalmente nos primeiros períodos de reparo ósseo alveolar. De fato, ao 7 dia de reparo, é o período onde encontramos maior numero de células inflamatórias no reparo ósseo em camundongos (VIEIRA et al, 2015). O caráter pró-inflamatório das DAMPs, em especial do HMGB1. Também, observou-se que a marcação para RAGE apresentava-se em sua maioria ao redor do tecido ósseo, sugerindo um papel importante deste receptor e seus ligantes em uma resposta inflamatória óssea. Sendo o HMGB1 um alvo em potencial para o estudo do reparo ósseo de forma geral.

De acordo como uma rápida análise histológica descritiva, notou-se uma sequência de reparo similar entre camundongos WT e GLY. Tais resultados são compatíveis com a cronologia de reparo ósseo alveolar em camundongos WT, já descrita em trabalhos anteriores (VIEIRA et al., 2015; REPEKE et al., 2010). Com isso, podemos inicialmente observar que a inibição de HMGB1 não foi capaz de impedir a regeneração óssea alveolar pós exodontia do incisivo em camundongos. Assim, mesmo com as particularidades que os camundongos GLY apresentaram no processo de reparo ósseo, ao final dos 21 dias pós-extração o alvéolo se encontrava totalmente reparado. Adicionalmente, a inibição não alterou a ordem cronológica dos eventos, fato este que pode minimizar a importância de tal alvo a primeira vista, porém é essencial do ponto de vista farmacológico, uma vez que o objetivo em longo prazo de estudos de reparo ósseo é facilitar o processo e não pará-lo por completo ou atrapalhá-lo.

Porém, apesar da sequência do processo de reparo ósseo alveolar apresentarem semelhanças entre os grupos, a inibição de HMGB1 interferiu na quantidade de alguns parâmetros analisados da resposta em determinados períodos de tempo. Em relação aos camundongos GLY, que corresponde a camundongos com a inibição da proteína HMGB1, observou-se uma densidade de volume de osteoblastos maior no período mais tardio da

análise do reparo. De fato, em relação ao tecido ósseo e mais especificamente ao reparo ósseo, HMGB1 demonstra ser liberada por osteoblastos e osteócitos, apresentando-se como molécula alvo para a inicialização da resposta inflamatória pós injúria óssea (YANG et al., 2008). Além do mais, estudos afirmam que HMGB1 pode melhorar significativamente a migração de osteoblastos e que as vias de TLR2 / TLR4 dependentes de NF-κB, os quais estão envolvidos na migração de osteoblastos induzida por HMGB1. Além disso, estudos afirmam que HMGB1 medeia diretamente a diferenciação osteoblástica de células de polpa dental humana.

Estudo recente revelou um mecanismo inovador pelo qual o HMGB1 induz a biomíneralização, no qual HMGB1 induz a secreção de vesículas de matriz extracelular (MVs) por macrófagos e subsequente a mineralização *in vitro* e *in vivo*. Após a interação de HMGB1 com o receptor RAGE, é ativada uma cascata de sinalização envolvendo proteína quinase ativada por mitógeno P38 (p38 MAPK) e esfingomielinase-2 neutra (nSMase2) que promove a secreção de MVs (CHEN et al., 2017).

Em condições homeostáticas, a reabsorção da matriz óssea através dos osteoclastos resulta na liberação de fatores de crescimento e mediadores osteoblastogênicos responsáveis pelo aumento na expressão de moléculas envolvidas na diferenciação e ativação de osteoblastos, como o fator de transcrição Runx2; proteínas produzidas pelos osteoblastos durante a formação da matriz orgânica do tecido ósseo, como o colágeno do tipo 1 (COL-1) e osteocalcina (OCN); e durante o processo de mineralização, como a fosfatase alcalina (ALP); sendo em conjunto mediadores essenciais aos processos de osteogênese de reparo ósseo (BAEK; KIM, 2011; LONG, 2011). Assim, o resultado por nós encontrado na quantidade de osteoclastos, os quais se mostraram mais presentes nos camundongos GLY, pode explicar uma maior reabsorção e uma maior liberação de fatores de crescimento que auxiliam na osteoblastogênese, como as BMPs que são liberadas da matriz óssea.

A presença exacerbada de fatores osteoclastogênicos é a principal causa da reabsorção óssea patológica, a presença destes mesmos fatores na quantidade "ideal" é fundamental no processo de reparo ósseo, mediando à maturação do osso primário em osso secundário (MILLS; SIMPSON, 2012). Portanto, alterações no balanço da expressão destes fatores osteoclastogênicos estão relacionadas como eventos chaves na patogênese de doenças inflamatórias no tecido ósseo (BOYCE; XING, 2008; REPEKE et al., 2010). Apesar de estudos demonstrarem que a liberação de HMGB1 influencia na osteoclastogênese, existem outras DAMPs que são liberados e se ligam a PRRs, em macrófagos, células dendríticas, monócitos e neutrófilos e promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo

fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina IL- 6 e IL-1, que induz a expressão de RANKL. (ZHOU et al., 2008; KOMORI, 2016). Estudo afirma que a necrose dos osteócitos aumenta ainda mais a expressão de RANKL e a osteoclastogênese, que foram desencadeadas por ATP liberados de osteócitos que sofreram apoptose, induzidos, ativados e eliminados da superfície óssea vizinha, levando à remodelação de partes ósseas.

A grande quantidade de osteoclasto e osteoblasto observado nos períodos finais do reparo ósseo não interferiram na densidade de matriz óssea, o que pode sugerir um atraso na maturação do tecido. A reabsorção óssea no período tardio é responsável pela formação dos canais medulares e lamelas, sendo formado um osso lamelar e não primário. Esses resultados corroboram com análise histomorfológica, na qual o HMGB1 não influenciou de forma direta na formação óssea, porém influenciou na qualidade do osso. Portanto, as alterações relacionadas à inibição de HMGB1, não interferiu no processo de formação óssea propriamente dita.

6. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos, concluímos que:

A inibição da proteína HMGB1 não foi capaz de interferir na sequência de eventos do reparo ósseo alveolar em camundongos, ou interrompendo por completo o reparo ósseo alveolar. Também, não foi capaz de interferir na densidade de volume de matriz óssea mineralizada em nenhum dos períodos analisados. Porém, observou-se uma maior quantidade de tecido ósseo de forma geral, muito devido ao aumento da densidade de volume de osteoclasto e osteoblastos nos períodos mais tardios do reparo.

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 139–162, 23 abr. 2011.
- BAEK, W. Y.; KIM, J. E. Transcriptional regulation of bone formation. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 126–135, 2011.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 2006.
- BIDWELL, J. P.; YANG, J.; ROBLING, A. G. Is HMGB1 an osteocyte alarmin?. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2008.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL / RANK / OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.
- CHEN, X. et al. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, p. 1–9, 2017.
- DING, K.-H. et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 4, p. 1091–7, 24 fev. 2006.
- FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, 2009.
- JACOBSSON, S.A.; DJERF, K.; IVARSSON, I.; WAHLSTROM, O. Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite-coated implants. **An experimental study**. J Bone Joint Surg Br, v. 76, n. 5, p.831-3, 1994.
- KALYVAS, D.G.; TARENIDOU, M. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. **J Oral Sci**, v.50, n. 3, p. 239-49, sep. 2008.
- KOMORI, T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, 6 dez. 2016.

- LIN, Z. et al. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. **Journal of periodontology**, v. 82, n. 7, p. 1007–17, jul. 2011.
- LONG, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 27–38, 2011.
- MAGNA, M.; PISETSKY, D. The role of HMGB1 in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Diseases. **Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1, 2014.
- MIDWOOD, K. S.; PICCININI, A. M. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators of Inflammation**, 2010.
- MILLS, L. A; SIMPSON, A H. R. W. In vivo models of bone repair. **The Journal of bone and joint surgery. British volume**, v. 94, n. 7, p. 865–74, 2012.
- MOLLICA, L. et al. Glycyrrhizin Binds to High-Mobility Group Box 1 Protein and Inhibits Its Cytokine Activities. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 4, p. 431–441, abr. 2007.
- PERES, J.A.; LAMANO, T. Strategies for stimulation of new bone formation: a critical review. **Braz Dent J**, v. 22, n. 6, p. 443-448, 2011.
- REPEKE, C.E.; FERREIRA, S.B. Jr; CLAUDINO, M.; SILVEIRA, E.M.; de ASSIS, G.F.; AVILA CAMPOS, M.J.; et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. **Bone**. v. 46, n. 4, p. 1122-30, Apr. 2010.
- SAKAI, E. et al. Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 2, p. 486–498, 2012.
- SORCI, G. et al. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research**, 2013.
- TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158–175, 2012.

- THEILL, L.E.; BOYLE, W.J.; PENNINGER, J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p. 795-823, 2002.
- VIEIRA, A. E. et al. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: Micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.
- YANG, J. et al. HMGB1 is a bone-active cytokine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 214, n. 3, p. 730–739, mar. 2008.
- ZHAO, F. et al. Glycyrrhizin Protects Rats from Sepsis by Blocking HMGB1 Signaling. **BioMed research international**, v. 2017, p. 9719647, 2017.
- ZHOU, Z. et al. HMGB1 Regulates RANKL-Induced Osteoclastogenesis in a Manner Dependent on RAGE. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 7, p. 1084–1096, 2008.